

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-216493

(43)Date of publication of application : 08.09.1988

(51)Int.Cl.

C12P 19/12  
// (C12P 19/12  
C12R 1:06 )

(21)Application number : 62-049955

(71)Applicant : NIPPON SHOKUHIN KAKO LTD

(22)Date of filing : 06.03.1987

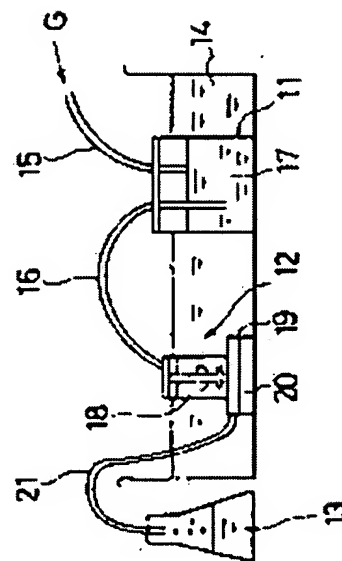
(72)Inventor : CHIBA MASAYA  
OKADA GENTAROU  
NAKAKUKI TERUO

## (54) PRODUCTION OF HIGH-PURITY ISOMALTOSE

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the titled compound in high purity and yield without using a purification process such as chromatographic separation, by treating dextran with an acid, treating the acid-treated liquid with isomaltodextranase to effect enzymatic reaction and passing the reaction mixture through a fractionation membrane.

**CONSTITUTION:** A substrate solution 17 produced by the acid treatment of dextran is stored in a reservoir 11 and transferred to a reaction vessel 18 by the pressure of nitrogen gas G supplied through a gas introduction pipe 15. The acid-treated substrate solution is added with isomaltodextranase and subjected to enzymatic reaction under agitation with a stirrer 20. The enzymatic reaction liquid is passed through a fractionation membrane 19 and the permeated liquid is transferred through a delivery pipe 21 to a storage tank 13 to obtain high-purity isomaltose.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-216493

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)9月8日

C 12 P 19/12  
// (C 12 P 19/12  
C 12 R 1:06)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 高純度イソマルトースの製造方法

⑯ 特 願 昭62-49955

⑰ 出 願 昭62(1987)3月6日

⑱ 発 明 者 千 葉 誠 哉 北海道札幌市西区手稲宮の沢383  
⑱ 発 明 者 岡 田 岐 太 郎 静岡県静岡市大谷3800-151番地  
⑱ 発 明 者 中 久 喜 輝 夫 静岡県三島市加茂57 加茂グリーンヒル7号  
⑲ 出 願 人 日本食品化工株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目4番1号  
⑳ 代 理 人 弁理士 松 井 茂

# 明 細 書

## 1. 発明の名称

高純度イソマルトースの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

デキストランを酸処理する工程と、この酸処理液にイソマルトデキストラナーゼを作用させて酵素反応を行なう工程と、この酵素反応液を分画用膜に透過させる工程とを含むことを特徴とする高純度イソマルトースの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

### 「技術分野」

本発明は、デキストランを原料として高純度のイソマルトースを製造する方法に関する。

### 「従来技術およびその問題点」

従来、特に高純度のイソマルトースは、高価なものであり、研究用試薬として少量生産されているにすぎなかった。ところが、近年、イソマルトースが抗う触性を有すること(特開昭58-76083号参照)、およびヒトの腸内有用細菌であるビヒダス菌の増殖効果を有すること(特開昭61-22777

号参照)などが報告され、イソマルトースの利用分野が拡大され始めている。実隙に、イソマルトースを20%(w/w)程度含有する水飴が一部市販されている。

現在、イソマルトースの製造方法としては、マルトースまたはマルトース水飴などを原料としてカビの生産する $\alpha$ -グルコシダーゼの一種であるマルトーストランスグルコシダーゼを作用させる方法(J. H. Pazur and I. Ando, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol I, p. 319 ~ 320, および特開昭61-219345号参照)、または、60%(w/w)以上の高濃度のグルコース溶液にアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)起源のグルコアミラーゼを作用させて調製する方法(特開昭61-219392号参照)などが採用されている。

しかしながら、これらの方法では、生成された糖液中におけるイソマルトースの含量は、せいぜい25~28%(w/w)程度であり、イソマルトースの純度を上げるためには、各種のクロマト分離、例えばゲルろ過クロマトグラフィー、カーボンカラ

ムクロマトグラフィー、または、強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーによる精製が必要とされた。また、上記の方法では、イソマルトースと同重合度を有するマルトースも大量生成するため、各種のクロマト分離を適用してもマルトースの混入が避けられず、高純度イソマルトースの調製は困難であった。

また、デキストランを原料として、これを酸分解した後、カーボン・セライトカラムクロマトグラフィーを用いて精製する方法(W. J. Whelan., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. I, p. 321 ~ 324 参照)も提案されている。

しかしながら、この方法によって得られるイソマルトースの収率は、原料あたり20%(w/w)程度でしかなく、生産コストが高くなるという問題点があった。

このように、イソマルトースを高純度で、しかも高収率で製造する方法は、未だ見出されておらず、このことが、イソマルトースの広範囲の利用を妨げる要因となっていた。

外のところで反応が停止し、せいせい30~40%のイソマルトースしか得られない。

すなわち、第3図には、0.1%濃度および0.2%濃度の各デキストラン水溶液にイソマルトデキストラナーゼを直接作用させた場合における反応時間と分解率の関係が示されている。図中、Aは0.1%濃度のデキストラン水溶液を用いた結果であり、Bは0.2%濃度のデキストラン水溶液を用いた結果である。このように、デキストランにイソマルトデキストラナーゼを直接作用させた場合には、その分解率が30~40%で止まってしまうことがわかる。

そこで、本発明者らは、鋭意検討した結果、まず、デキストラン中の $\alpha$ -1,6-グルコシド以外の結合、すなわち、 $\alpha$ -1,2-、 $\alpha$ -1,3-および $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を選択的に酸処理により分解した後、イソマルトデキストラナーゼを作用させることにより、イソマルトースを高収率で生成できることを見出し、また、こうして生成されたイソマルトースを分画用膜に透過させて選択的

#### 「発明の目的」

本発明の目的は、イソマルトースを高純度かつ高収率で製造できるようにした高純度イソマルトースの製造方法を提供することにある。

#### 「発明の構成」

本発明による高純度イソマルトースの製造方法は、デキストランを酸処理する工程と、この酸処理液にイソマルトデキストラナーゼを作用させて酵素反応を行なう工程と、この酵素反応液を分画用膜に透過させる工程とを含むことを特徴とする。

本発明において、原料として用いられるデキストランは、グルコースが主に $\alpha$ -1,6-グルコシド結合で連結した多糖であるが、その分子中には、 $\alpha$ -1,2-、 $\alpha$ -1,3-および $\alpha$ -1,4-グルコシド結合も一部存在することが明らかにされている(R. L. Sidebopham., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30 371(1974)参照)。したがって、デキストランにイソマルトデキストラナーゼを直接作用させた場合には、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合以

に取出すことにより、イソマルトースが高純度で得られることを見出し、これらの事実に基づいて本発明を完成するに至ったのである。

本発明の原料であるデキストランは、例えば「デキストラン T2000」(商品名、ファルマシア特製)などの市販のものを使用することができる。また、デキストラン生合成菌であるロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)などを用いて、下記文献記載の方法により、シュークロースを炭素源として培養することによって調製することも可能である(E. J. Hehre., *Science.*, 93, 237(1941)., E. J. Hehre and J. V. Sugg., *J. Exptl. med.*, 76, 339(1942)., A. Jeanes et al., *J. Biol. Chem.*, 176, 603(1948)参照)。

本発明においては、上記デキストランを酸処理するのであるが、この場合、酸としては塩酸、硫酸など各種のものを使用できる。また、酸の濃度は、基質濃度0.1~0.2%(w/w)の場合、0.04~0.5 N が好ましく、さらには0.05~0.3 N が好ま

第1表

基質	結合様式	k × 10 (sec)
マルトース	α-1,4	16.3
ニゲロース	α-1,3	14.1
コージビオース	α-1,2	17.3
イソマルトース	α-1,6	5.0

しい。なお、基質濃度を高くする場合には、それに対応して酸の濃度を高くすればよい。さらに、処理温度は、90~100℃が好ましく、95~100℃がより好ましい。処理時間は、1~10時間程度が好ましく、2~7時間がより好ましい。したがって、酸処理は、所定の規定濃度の酸に、一定濃度にデキストランを溶解し、上記のような条件で処理することにより行なうことができる。なお、本発明者らの検討した結果によれば、0.1N HCl、99.5±0.1℃で処理した場合、それぞれの結合の酸分解における速度を擬一次反応の速度定数kで比較すると、第1表のようになった(M.L. Wolfrom et. al., Cereal Chem., 40, 82(1963), 千葉ら、澱粉科学 25, 111(1978)より引用)。このように、酸処理により、α-1,2-、α-1,3- およびα-1,4- グルコシド結合が、α-1,6- グルコシド結合に先立って選択的に分解されることがわかる。

(以下、余白)

東京大学応用微生物研究所(東京都文京区弥生1-1-1)に寄託番号IAM12103として寄託されており、また、Northern Regional Research Center, Peoria, Ill., U.S.A.に寄託番号NRRL B-4425として寄託されており、誰でも容易に入手できる微生物である。

この菌株を用いたイソマルトデキストラナーゼの製造は、例えば次のようにして行なうことができる。まず、ジャーファーメンターを用い、1%デキストラン、0.2% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.02% CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O および1%ポリペプトンを含む3ℓの液体培地に上記菌株を接種し、8ℓ/minの通気、攪拌をしながら、25℃で48時間培養する。次に、この培養液を遠心分離機(10,000×g)にかけて菌体を除去し、得られる上清液に2倍量の蒸留水を加え、1N HClでpH4.5とする。そして、0.025 mol McIlvaine 緩衝液(pH 4.5)で予め平衡化されているCM-セルロースに、イソマルトデキストラナーゼを選択的に吸着させてカラムに流し込み、0.7 mol NaCl含有の上

次に、上記のようにして酸処理したデキストラン溶液を等規定のアルカリ溶液で中和した後、イソマルトデキストラナーゼ(isomaltodextranase, 別名1,6-α-D-Glucan isomaltodextranase, E.C. 3.2.1.94)による酵素反応を行なう。

本発明で使用するイソマルトデキストラナーゼは、例えばアルスロバクター・グロビホルミス(*Arthrobacter globiformis*)に属するイソマルトデキストラナーゼ生産菌を培養し、その培養物から採取することができる。かかるイソマルトデキストラナーゼ生産菌としては、例えばアルスロバクター・グロビホルミスT6株(*Arthrobacter globiformis* T6株)が知られている。この菌株は、

緩衝液中で溶出することにより、高純度のイソマルトデキストラナーゼを高収率で得ることができる。なお、本発明においては、アルスロバクター・グロビホルミス(*Arthrobacter globiformis*)属以外の微生物によって製造されたイソマルトデキストラナーゼを使用することもできる。

イソマルトデキストラナーゼの反応条件について述べると、反応液のpHは、4.5~6.0が好ましく、5.0~5.5がさらに好ましい。このため、上記のようなpHとなるように、所定濃度の緩衝液を用いることが好ましい。また、反応温度は、30~70℃が好ましく、35~65℃がさらに好ましい。さらに、イソマルトデキストラナーゼの基質に対する添加量は、反応速度に関係するのみであり、特に限定する必要はないが、通常、基質1g当り5単位以上、好ましくは10単位以上添加するのが適当である。なお、本発明において、イソマルトデキストラナーゼの酵素活性は、デキストランを基質として、pH5.3、30℃の条件下で酵素反応を行ない、1分間に1μmolのグルコシド結合を切断

する酵素量を1単位としている。また、反応液中に、安定剤として牛血清アルブミン等を添加することにより、イソマルトデキストラナーゼ活性を有効に保ちつつ反応を行なうことができる。

次に、本発明では、上記のようにイソマルトデキストラナーゼを作用させて得られた酵素反応液を分画用膜に透過させて、生成されたイソマルトースを高純度で採取するようにする。この場合、分画用膜としては、種々の逆浸透膜や、分子量10,000~20,000以下の分子のみを透過させる限外ろ過膜などが有効に用いられる。この場合、酵素反応および膜処理は、酵素反応が終了した後に、反応液を取出して膜処理を行なうバッチ反応式で行なってもよく、あるいは、酵素反応を行ないながら順次反応液を取出して膜処理を行なう連続反応式で行なってもよい。

第1図には、連続反応式による製造装置の一例が示されている。すなわち、この装置は、リザーバー11、反応装置12、貯槽13からなり、リザーバー11および反応装置12は、恒温槽14中に浸

漬されている。リザーバー11には、窒素ガスGなどの気体導入管15と、基質溶液供給管16とが接続されている。そして、リザーバー11には、基質溶液17が入れられ、気体導入管15から窒素ガスGなどを導入することにより、その圧力で基質溶液17が徐々に基質溶液供給管16から押出されるようになっている。反応装置12は、反応容器18、分画用膜19、スターラー20で構成されており、前記基質溶液供給管16は、反応容器18に接続されている。また、分画用膜19を透過した反応液は、取出し管21を通過して貯槽13に貯留されるようになっている。

したがって、この装置では、リザーバー11内にデキストランを酸処理してなる基質溶液を貯留しておき、反応装置12の反応容器18内にイソマルトデキストラナーゼおよび必要に応じて牛血清アルブミン等の安定剤を含有する溶液を貯留しておく。この状態で、気体導入管15から窒素ガスGを徐々に導入しつつ、スターラー20により反応容器18中の基質溶液を攪拌して酵素反応させる。窒素

ガスGの圧力により、リザーバー11中の基質溶液17が徐々に反応容器18中に導入されるので、反応容器18中の反応液は、徐々に分画用膜19を透過し、取出し管21を通過して貯槽13中に貯留されるようになっている。このようにして、基質溶液17を連続的に反応容器18に供給し、反応容器18内で酵素反応を行ないつつ、生成したイソマルトースを選択的に分画用膜19から透過させて、高純度のイソマルトース含有液を採取することができる。

#### 「発明の実施例」

##### 実施例1

「デキストランT2000」(商品名、ファルマシア特製)0.5gを0.5N塩酸100mlに溶解した後、温水湯浴(95℃)で4時間処理し、デキストランの加水分解を行なった。次いで、等規定の水酸化ナトリウム溶液100mlを用いて中和した後、さらに0.05M酢酸緩衝液(pH5.0)300mlを添加して基質溶液とした。

そして、第1図に示したような製造装置を用いて酵素反応を行なった。すなわち、上記基質溶液

17をリザーバー11に入れ、イソマルトデキストラナーゼ13.8単位および牛血清アルブミン(500μg/ml)を含有する水溶液10mlを反応容器18に入れ、分画用膜19として「ダイアフロPM10」(商品名、アミコン社製、分子量カット10,000)を用い、リザーバー11に0.1~0.3気圧/cmの窒素ガスを送りながら、37℃で32時間連続的に反応および分画を行なった。

次に、分画用膜19を透過したろ液を減圧濃縮機により濃縮し、得られたイソマルトースの純度を「Bio-Gel P-2」(商品名、バイオ・ラド社製)によるゲルろ過クロマトグラフィーによって検定した。なお、溶出液は蒸留水、溶出速度は42ml/hrとした。この結果を第2図に示す。図中、Cはイソマルトースのピーク、Dはグルコースのピークである。このように、グルコースのわずかなピークが認められるものの、大部分はイソマルトースであった。この結果、イソマルトースの純度は96%以上であり、回収率は固形分当り約65%であった。

## 実施例2

「デキストランT2000」(商品名、ファルマシア製) 0.5 g を0.2 N 塩酸100 mlに溶解し、実施例1と同様に酸処理した後、同様に37℃で32時間酵素反応および膜分画を行なった。その結果を第2表に示す。

## 実施例3

「デキストランT2000」(商品名、ファルマシア製) 1.0 g を0.2 N 塩酸100 mlに溶解し、実施例1と同様に酸処理した後、同様に37℃で32時間酵素反応および膜分画を行なった。その結果を第2表に示す。

(以下、余白)

第2表(実施例2および3の結果)

	実施例2	実施例3
デキストラン濃度 %(w/v)	0.5	0.1
膜透過液分解率 (%)	78.0	94.6
膜透過液中のイソマル トース純度 %(w/v)	98.3	82.0
イソマルトースの回収 率(固形分当りの%)	84.8	70.5

注) 加水分解における塩酸濃度: 0.2 N

酵素反応および膜処理時間: 32時間

膜処理における窒素圧力: 0.1 atm/cm<sup>2</sup>

膜透過液流速: 14.1 ml/hr

以上、実施例1、2、3の結果より、イソマルトースの純度は約82~98%(w/w)であり、その回収率も約65~71%と高いことがわかる。

## 「発明の効果」

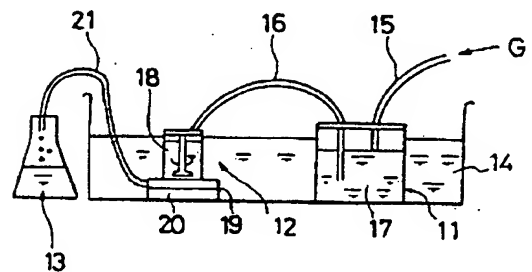
以上説明したように、本発明によれば、デキストランを酸処理し、この処理液にイソマルトデキストラナーゼを作用させ、生成されたイソマル

トースを分画用膜を透過させて採取するようにしたので、イソマルトースを高純度かつ高収率で得ることができる。また、クロマト分離などの精製工程を必要とせず、極めて簡単な工程で高純度のイソマルトースを製造できるので、産業上、極めて有効な方法と考えられる。

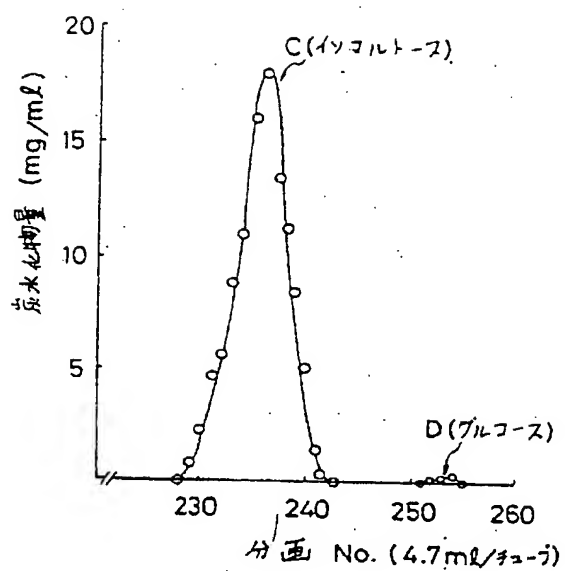
## 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明における酵素処理および膜処理に用いられる装置の一例を示す概略図、第2図は本発明の実施例で得られた透過液のゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図、第3図は0.1%および0.2%のデキストラン水溶液を基質としてイソマルトデキストラナーゼを作用させた場合の分解率の経時変化を示す図である。

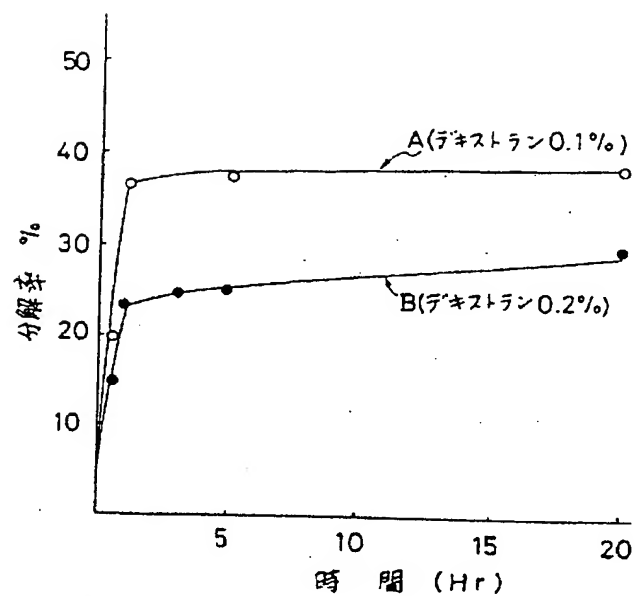
図中、11はリザーバー、12は反応装置、13は貯槽、14は恒温槽、15は気体導入管、16は基質溶液供給管、17は基質溶液、18は反応容器、19は分画用膜、20はスターラー、21は取出し管である。



第1図



第 2 図



第 3 図